

农杆菌介导超高产大豆子叶节遗传转化研究

贾钰莹¹, 蒋滢², 赵强¹, 谢甫缙¹, 于翠梅¹

(1. 沈阳农业大学 农学院, 辽宁 沈阳 110866; 2. 沈阳师范大学 生化与化学与生命科学学院, 辽宁 沈阳 110034)

摘要: 为建立一个大豆子叶节高效遗传转化体系用于大豆基因工程育种, 以超高产大豆品种为材料, 子叶节为外植体进行了遗传转化, 研究了农杆菌侵染的菌液浓度、侵染时间、共培养基中乙酰丁香酮浓度及共培养时间等影响农杆菌转化的因素。结果表明: 适宜转化的侵染和共培养条件为侵染菌液浓度 $OD_{600} = 0.5$, 侵染时间 30 min, 共培养基含有乙酰丁香酮浓度 $200 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 共培养时间为 3~4 d。并以此条件对不同基因型超高产大豆品种进行农杆菌转化, 结果显示大豆基因型对农杆菌的敏感性存在显著性差异, 以沈农 9 号最敏感, 沈农 12 次之, 中黄 35 最差。

关键词: 超高产大豆; 根癌农杆菌; 子叶节; 转化

中图分类号: S565.1

文献标识码: A

DOI: 10.11861/j.issn.1000-9841.2014.05.0634

Study on *Agrobacterium*-mediated Transformation System of Super-high-yielding Soybean Cotyledon Node

JIA Yu-ying¹, JIANG Ying², ZHAO Qiang¹, XIE Fu-ti¹, YU Cui-mei¹

(1. College of Agronomy, Shenyang Agricultural University, Shenyang 110866, China; 2. College of Chemistry and Life Science, Shenyang Normal University, Shenyang 110034, China)

Abstract: To establish a high frequency genetic transformation system of soybean cotyledon node for soybean genetic engineering, *Agrobacterium* concentration, infection time, co-cultivation time and acetosyringone concentration of co-culture medium during soybean cotyledonary node transformation were studied by using soybean cultivars with super-high-yielding. The results showed that the optimal conditions were *Agrobacterium* concentration $OD_{600} = 0.5$, infection time 30 min, co-cultivation time 3-4 days and acetosyringone concentration $200 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$. Using the optimized transformation procedure, different genotypes of super-high-yielding soybeans were transformed and the sensitivity of soybean genotypes to *Agrobacterium tumefaciens* was significant differently. Shennong 9 was the most sensitive material, followed by Shennong 12, and Zhonghuang 35 was the least sensitive material.

Key words: Super-high-yielding soybeans; *Agrobacterium tumefaciens*; Cotyledonary node; Transformation

大豆 (*Glycine max* L.) 是重要的油料作物, 利用遗传转化技术进行遗传改良的基因工程育种已成为当今大豆育种研究的热点^[1]。高效遗传转化一直是大豆基因工程领域的难点之一^[2-3]。Hinchee 等^[4]首次利用农杆菌介导法转化大豆子叶节获得转基因植株, 之后以子叶^[5]、胚性悬浮系^[6]、胚尖^[7]、愈伤组织^[8]等外植体建立了农杆菌转化体系。其中子叶节再生体系具有再生时间短、外植体容易获得、再生过程简单、再生频率高等优点, 已成为目前较为成熟的大豆农杆菌转化的受体系统^[9]。大量研究表明基因型、农杆菌菌株、农杆菌菌液浓度、农杆菌侵染时间、共培养时间及乙酰丁香酮 (AS) 的浓度等因素都影响农杆菌介导转化大豆子叶节法的转化效率^[10-13]。

本研究以超高产大豆品种为试材, 对农杆菌侵

染及共培养阶段的培养条件进行探讨, 并在此基础上比较超高产大豆品种对农杆菌易感性的差异, 为超高产大豆应用于基因工程的研究提供参考。

1 材料与方法

1.1 供试材料

1.1.1 基因型 以在大豆生产实践中创造过超高产纪录的品种 (超高产品种) 辽豆 14、沈农 12、中黄 35 及沈农 9 号为试材, 均为丛生芽诱导率在 70% 以上的适宜再生基因型, 由沈阳农业大学大豆研究所提供。

1.1.2 菌株与质粒 农杆菌菌株 EHA105, 由吉林省农业科学院生物技术中心提供。质粒 pCAM-BIA3301-1 图谱见图 1, 携带 *bar* 基因和 *GUS* 报告基因。

收稿日期: 2013-12-09

基金项目: 转基因生物新品种培育重大专项 (2013ZX08004-004-003-004)。

第一作者简介: 贾钰莹 (1987-), 女, 博士, 主要从事大豆遗传转化研究。E-mail: jiayuyinggood@163.com。

通讯作者: 于翠梅 (1974-), 女, 博士, 副教授, 主要从事大豆遗传转化与基因工程。E-mail: yucumei@163.com。

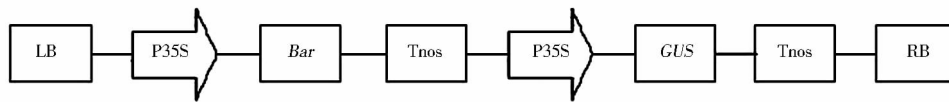


图1 质粒 pCAMBIA3301-1 图谱

Fig. 1 Map of vector pCAMBIA3301-1

1.2 方法

1.2.1 外植体准备 采用氯气灭菌法对大豆种子消毒,然后接种于萌发培养基中,26℃培养5 d,光照16 h 黑暗8 h。取萌发培养后的大豆种子,用解剖刀沿种子中线纵向切开,使两片子叶分开,除去顶芽和腋芽,制备子叶节外植体。

1.2.2 培养基 萌发培养基: B₅ 基本培养基 (pH 5.8); 侵染培养基: 1/10 B₅ 基本培养基 + 3.9 g·L⁻¹ MES + 1.7 mg·L⁻¹ 6-苄氨基腺嘌呤 (6-BA) + 0.25 mg·L⁻¹ 赤霉素 (GA₃) + 400 mg·L⁻¹ 半胱氨酸 (Cys) + 154.2 mg·L⁻¹ 二硫苏糖醇 (DTT) (pH5.4); 共培养基: 1/10 B₅ 基本培养基 + 1.7 mg·L⁻¹ 6-BA + 0.25 mg·L⁻¹ GA₃ + 400 mg·L⁻¹ Cys + 154.2 mg·L⁻¹ DTT + AS (pH5.4); 芽诱导培养基: B₅ 基本培养基 0.39 g·L⁻¹ MES + 1.7 mg·L⁻¹ 6-BA + 100 mg·L⁻¹ 头孢青霉素 (cef) + 250 mg·L⁻¹ 替卡西林 (Tic) + 4 mg·L⁻¹ 草铵膦 (PPT) (pH5.8)。

1.2.3 农杆菌菌液的制备 从超低温冰箱里保存的甘油菌中挑取少量菌接种到含有抗生素 (50 mg·mL⁻¹ Kan 和 25 mg·mL⁻¹ Rif) 的 YEP 固体培养基上,28℃ 倒置培养 2~3 d。从单菌落挑菌接种于含 50 mg·mL⁻¹ Kan 和 25 mg·mL⁻¹ Rif 的 5 mL YEP 液体培养基中,28℃,180 r·min⁻¹ 振荡培养 24 h。取菌液 1 mL 到 100 mL YEP 液体培养基中过夜培养,至 OD₆₀₀ = 0.5~0.6。菌液在 5 000 r·min⁻¹ 离心 10 min 收集菌体,然后重悬于用等体积 50 mL 侵染培养基中,备用。

1.2.4 大豆子叶节遗传转化 以沈农 9 号大豆子叶节外植体,在子叶节区域切 3~5 刀的伤口,然后放置到培养皿中,试验中设计农杆菌浓度 OD₆₀₀ 分别为 0.1,0.3,0.5,0.8,1.0,1.2 时侵染大豆子叶节,用农杆菌分别侵染 15,30,45,60 min,然后用无菌滤纸吸干菌液,放在共培养基中培养,培养时间为 2,3,4,5,6 d。AS 浓度分别为 50,100,200,300,400 μmol·L⁻¹。共培养后转移到芽诱导筛选培养基中培养。每个培养皿中 10 个子叶节。26℃ 下培养,光照 16 h/8 h,每 10 d 更换 1 次培养基,20 d 后,统计抗性丛生芽的外植体数,计算抗性芽分化率。

抗性芽分化率 (%) = 抗 PPT 出芽外植体数/侵染的外植体数 × 100

1.3 数据分析

采用 Excel 2003 和 DPS v7.05 进行数据分析。

2 结果与分析

2.1 遗传转化条件的优化

2.1.1 农杆菌侵染浓度 由图 2 可知,农杆菌侵染菌液浓度 OD₆₀₀ 在 0.5 时,抗性芽再生率最高,为 75.65%。并且 OD₆₀₀ 在 0.5~0.8 时,差异不显著。当农杆菌菌液浓度超过 0.8 时,抗性芽再生率随着侵染浓度的升高而降低,说明高浓度农杆菌溶液对丛生芽的诱导有抑制作用。因此为便于以后除菌的操作,本着能够达到最大转化效率的最小菌液浓度的原则,本试验选用菌液浓度为 OD₆₀₀ = 0.5。

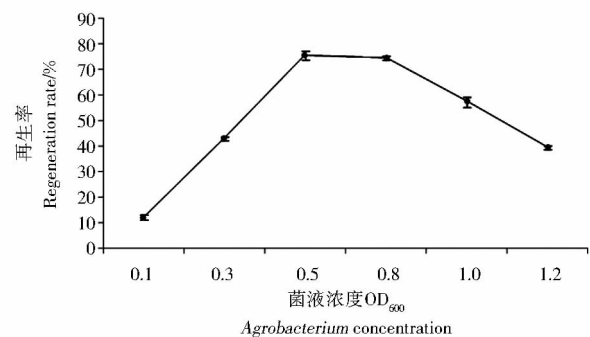


图2 菌液浓度对大豆抗性丛生芽再生率的影响

Fig. 2 Effect of *Agrobacterium* concentration on regeneration rate of resistant multiple shoots

2.1.2 农杆菌侵染时间 由图 3 可以看出,不同侵染时间的条件下,抗性丛生芽的诱导率呈现显著差异。以侵染 30 min 处理抗性丛生芽诱导率最高,达 74.54%,侵染 45 min 次之,为 62.39%,侵染 60 min

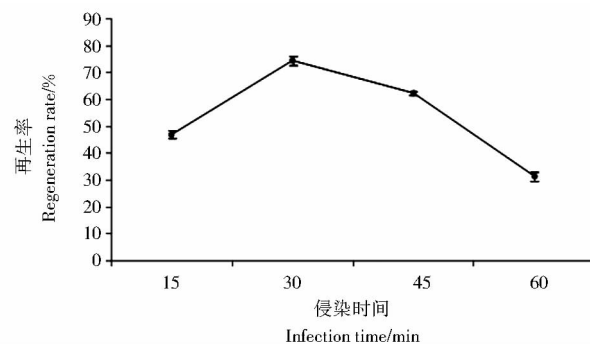


图3 侵染时间对大豆抗性丛生芽再生率的影响

Fig. 3 Effect of infection time on regeneration rate of resistant multiple shoots

时,抗性丛生芽诱导率最低,为31.31%。因此确定农杆菌侵染时间为30 min。

2.1.3 共培养基中 AS 浓度 由图4可知,随着乙酰丁香酮浓度从50 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 升高到200 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$,抗性芽再生率也逐渐升高,在AS浓度达200 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,抗性芽再生率达到最高,为73.58%。但是当AS浓度超过200 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 之后,抗性芽的再生率大大降低,说明添加的AS浓度过高会影响转化效率。

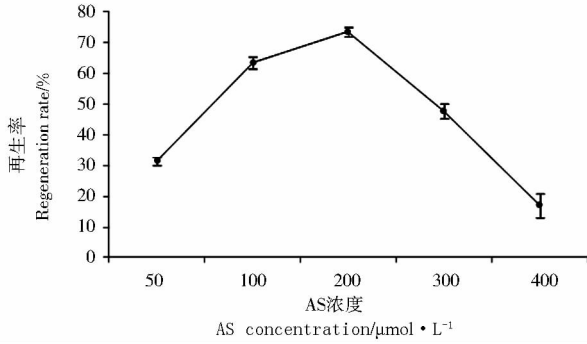


图4 AS浓度对大豆抗性丛生芽再生率的影响
Fig.4 Effect of AS concentration on regeneration rate of resistant multiple shoots

2.1.4 共培养时间 图5结果表明,共培养4 d,抗性芽再生率最高,达74.07%,与共培养3和5 d处理相比差异不显著,但显著高于共培养2及6 d的处理。当共培养到第5天和第6天时,在外植体周

围有农杆菌长出,后期抑菌困难。因此确定共培养时间为3~4 d。

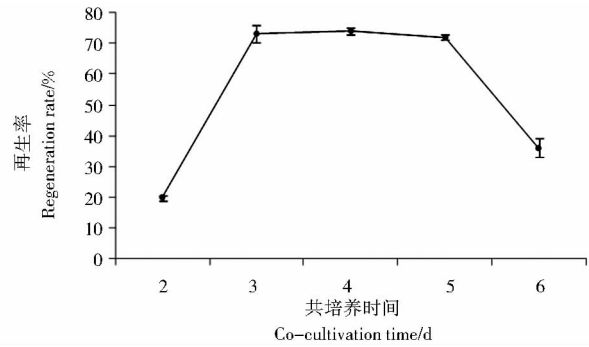
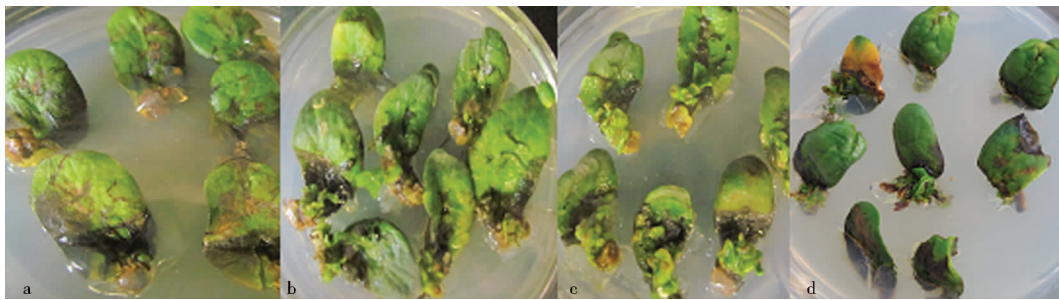


图5 共培养时间对大豆抗性丛生芽再生率的影响
Fig.5 Effect of co-culture time on regeneration rate of resistant multiple shoots

2.2 不同超高产品种转化效果比较

对4个超高产大豆品种进行农杆菌侵染,侵染菌液浓度为 $\text{OD}_{600}=0.5$,侵染时间为30 min,共培养基含有AS浓度为200 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$,共培养时间为3~4 d(图6和表1)。图6为4个品种转化20 d的图片,从中可以看出,沈农9品种抗性芽再生效果最好,而中黄35再生效果最差。进一步对再生的抗性芽数量进行统计分析,这4个超高产大豆基因型对农杆菌的易感性存在着显著差异(表1)。沈农9号是最易感的大豆基因型,抗性丛生芽再生率达到了77.64%,其次为沈农12,为64%,易感性最差的品



a. 中黄35;b. 沈农12;c. 沈农9号;d. 辽豆14。
a. Zhonghuang 35;b. Shennong 12;c. Shennong 9;d. Liaodou 14.

图6 不同超高产品种抗性丛生芽再生效果
Fig.6 Regeneration of resistant multiple shoots from different super-high-yielding soybean genotypes

表1 超高产大豆对农杆菌的易感性筛选

Table 1 Screening of super-high-yielding soybean genotypes susceptible to *Agrobacterium tumefaciens*

基因型 Genotype	侵染外植体个数 Explant			抗性丛生芽再生外植体数 No. of regenerational resistant multiple shoots			抗性丛生芽再生率 Regeneration rate of resistance multiple shoots/%			平均 Average
	I	II	III	I	II	III	I	II	III	
辽豆14 Liaodou 14	100	102	99	33	37	40	33.0	36.3	40.4	36.56 ± 2.14 c
沈农12 Shennong 12	98	100	100	68	62	61	69.4	62.0	61.0	64.00 ± 2.52 b
沈农9号 Shennong 9	98	102	100	75	82	76.0	76.5	80.4	76.0	77.64 ± 1.38 a
中黄35 Zhonghuang 35	99	101	102	12	10	9	12.1	9.9	8.8	10.28 ± 0.97 d

种为中黄 35,抗性丛生芽再生率仅为 10.28%。因此沈农 9 号为最适合遗传转化的基因型,对农杆菌具有高度的易感性。

3 结论与讨论

农杆菌菌液浓度、侵染时间、共培养时间是建立高效遗传转化体系的重要参数。菌液浓度过低,农杆菌细胞数目过少,不能实现有效的转化;浓度过高,农杆菌细胞间的竞争性抑制反而会降低转化效率,同时也对侵染材料有毒害作用。李文霞等^[9]以黑农 35 为试材,菌液浓度选择 $OD_{600} = 0.5$ 时取得较好转化效果。周延清等^[14]研究表明菌液浓度 OD_{600} 值在 0.60 ~ 0.79 时,大豆抗性丛生芽诱导率最大。李茂福等^[15]研究表明,菌液浓度 $OD_{600} = 0.5 \sim 0.8$ 时,大豆子叶节的芽诱导率最高,随着 OD_{600} 升高到 1.0 时,芽诱导率反而下降,本试验的结果与之相一致。农杆菌侵染时间和共培养时间直接影响 T-DNA 向植物细胞转移的机率。时间过短,农杆菌不能充分附着于外植体上,T-DNA 也不能有效地转移,从而降低了转化效率;而时间过长,由于农杆菌过度增殖会抑制受体细胞的呼吸作用,或者造成后期抑菌困难,都会降低转化效率。应珊等^[16]的研究表明,适宜的大豆子叶节与农杆菌共培养时间为 3 ~ 5 d,抗性芽分化率间差异不显著,但显著高于共培养 1 d。陈李森等^[11]以东农 50 为试材,获得农杆菌 $OD_{600} = 0.6$,侵染时间以 30 ~ 40 min,共培养 3 d 取得最好转化效果。以上不同研究结果的差异是由于选用不同基因型外植体,其适宜的侵染和培养条件相应有所不同所致。本试验确定了超高产大豆沈农 9 号大豆子叶节转化的最佳条件,即菌液浓度 $OD_{600} = 0.5 \sim 0.8$,侵染时间为 30 min,共培养时间为 3 ~ 4 d。AS 可诱导农杆菌 *Vir* 基因活化,从而促进外源基因的整合,是影响农杆菌介导的大豆转化的重要因素^[17]。本试验研究结果表明,共培养基中添加 $200 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ AS 可获得最高的抗性芽再生率,这与刘圣君等^[18]的研究结果相一致。

本研究选择了 4 个丛生芽诱导率在 70% 以上的超高产大豆品种进行转化研究,其对农杆菌易感性由易到难的顺序为:沈农 9 号 > 沈农 12 > 辽豆 14 > 中黄 35。因此超高产大豆沈农 9 号可作为大豆基因工程育种研究中优先选用的材料。

参考文献

[1] Hartman G L, West E D, Herman T K. Crops that feed the World 2. Soybean-worldwide production, use, and constraints caused by pathogens and pests[J]. Food Security, 2011, 3: 5-17.
 [2] Trick H N, Dinkins R D, Santarem E R, et al. Recent advances in soybean transformation[J]. Plant Tissue Culture and Biotechnology, 1997, 3: 9-26.
 [3] 刘海坤, 卫志明. 大豆遗传转化研究进展[J]. 植物生理与分子生物学报, 2005, 31(2): 126-134. (Liu H K, Wei Z M. Recent advances in soybean genetic transformation[J]. Plant Physiology and Plant Molecular Biology, 2005, 31(2): 126-134.)

[4] Hinchey M A W, Connor-Ward D V, Newell C A, et al. Production of transgenic soybean plants using *Agrobacterium*-mediated DNA transfer[J]. Nature Biotechnology, 1988, 6: 915-922.
 [5] Parrott W A, Williams E G, Hildebrand D F, et al. Effect of genotype on somatic embryogenesis from immature cotyledons of soybean[J]. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 1989, 16: 15-21.
 [6] Trick H N, Finer J J. Sonication-assisted *Agrobacterium*-mediated transformation of soybean [*Glycine max* (L.) Merrill] embryogenic suspension culture tissue [J]. Plant Cell Reports, 1998, 17: 482-488.
 [7] Liu H K, Chao Y, Wei Z M. Efficient *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of soybeans using an embryonic tip regeneration system[J]. Planta, 2004, 219: 1042-1049.
 [8] Hong H P, Zhang H, Olhoft P, et al. Organogenic callus as the target for plant regeneration and transformation via *Agrobacterium* in soybean (*Glycine max* L. Merr.) [J]. In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant, 2007(43): 558-568.
 [9] Yamada T, Takagi K, Ishimoto M. Recent advances in soybean transformation and their application to molecular breeding and genomic analysis[J]. Breed Science, 2012, 61: 480-494.
 [10] 李文霞, 宁海龙, 吕文河, 等. 农杆菌介导大豆子叶节转化系统的优化[J]. 中国农业科学, 2008, 41(4): 971-977. (Li W X, Ning H L, Lyu W H, et al. Optimization of the *Agrobacterium*-mediated transformation systems of soybean cotyledonary node[J]. Scientia Agricultura Sinica, 2008, 41(4): 971-977.)
 [11] 陈李森, 田星星, 单志慧, 等. 利用农杆菌介导法转化大豆子叶节的影响因素研究[J]. 大豆科学, 2012, 3(1): 17-23. (Chen L M, Tian X X, Shan Z H, et al. Optimization of the factors affecting genetic transformation of soybean cotyledonary node mediated by *Agrobacterium tumefaciens* [J]. Soybean Science, 2012, 3(1): 17-23.)
 [12] Dang W, Wei Z. An optimized *Agrobacterium*-mediated transformation for soybean for expression of binary insect resistance genes [J]. Plant Science, 2007, 173: 381-389.
 [13] Liu S J, Wei Z M, Huang J Q. The effect of co-cultivation and selection parameters on *Agrobacterium*-mediated transformation of Chinese soybean varieties[J]. Plant Cell Reports, 2008, 27: 489-498.
 [14] 周延清, 刘艳菊, 李敏, 等. 根瘤农杆菌介导反义 *fad2-1* 基因转化大豆的研究[J]. 河南农业科学, 2010(9): 17-21. (Zhou Y Q, Liu Y J, Li M, et al. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated Antisense *fad2-1* gene transfer to cotyledonary node cells of soybean (*Glycine max* L.) [J]. Journal of Henan Agricultural Sciences, 2010(9): 17-21.)
 [15] 李茂福, 李睿, 傅永福, 等. 农杆菌介导大豆遗传转化的影响因素[J]. 山地农业生物学报, 2006(4): 283-286. (Li M F, Li R, Fu Y F, et al. Influencing factors on the efficiency of *Agrobacterium*-mediated soybean transformation[J]. Journal of Mountain Agriculture and Biology, 2006(4): 283-286.)
 [16] 应珊, 何晓薇, 王秀荣, 等. 影响农杆菌介导的大豆转化效率的因素研究[J]. 分子植物育种, 2008, 6(1): 32-40. (Ying S, He X W, Wang X R, et al. Assessment of factors affecting the transformation efficiency of soybean cotyledonary-node *Agrobacterium*-mediated transformation system[J]. Molecular Plant Breeding, 2008, 6(1): 32-40.)
 [17] Xue R G, Zhang B, Xie H F. Overexpression of a *NTR1* in transgenic soybean confers tolerance to water stress[J]. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 2007, 89: 177-183.
 [18] 刘圣君, 黄健秋, 卫志明. 影响农杆菌介导的大豆子叶节遗传转化的因素[J]. 分子细胞生物学报, 2007, 40(5): 286-292. (Liu S J, Huang J Q, Wei Z M. Factors influencing *Agrobacterium*-mediated cotyledonary-node transformation of soybean (*Glycine max* L.) [J]. Journal of Molecular Cell Biology, 2007, 40(5): 286-292.)